

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0062186

(43) 공개일자 2025년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/0797 (2010.01)

G01N 33/50 (2017.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0697 (2013.01)

C12N 5/0623 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0146841

(22) 출원일자 2023년10월30일

심사청구일자 2024년01월05일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

최정우

서울특별시 용산구 서빙고로 35, 103동 603호

하태형

서울특별시 마포구 승문16가길 19-3

신민규

경기도 파주시 후곡로 50, 403동 101호

(74) 대리인

특허법인에스알비

전체 청구항 수 : 총 15 항

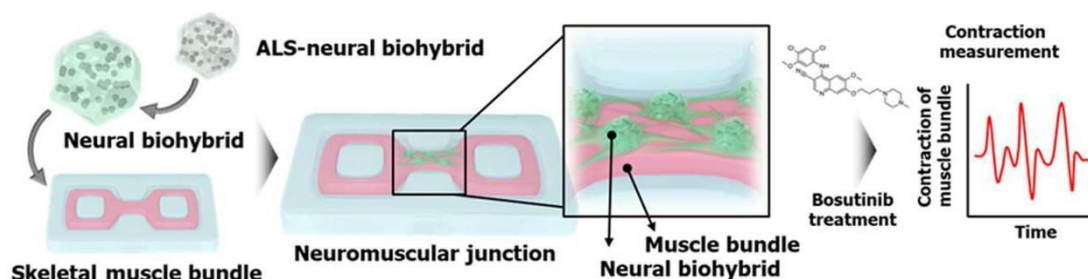
(54) 발명의 명칭 환원된 그래핀옥사이드 나노입자를 이용하여 제조된 신경 바이오하이브리드, 이를 이용한 신경근 접합부 모델 및 이를 이용한 약물 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 신경 바이오하이브리드, 이를 이용한 신경근 접합부 모델 및 이를 이용한 운동 신경 질환 관련 약물 스크리닝 방법에 관한 것이다.

본 발명자들은 본 발명의 신경 바이오하이브리드 및 이를 이용한 신경근 접합부 모델이 근위축성 측색 경화증(ALS) 치료를 위한 약물 스크리닝에 우수한 효과가 있다는 사실을 실험적으로 확인하였고, 이에 다양한 신경 질환에 대한 약물 스크리닝 및 독성 평가에 적용될 수 있을 것으로 전망된다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 5/0691 (2013.01)
G01N 33/5082 (2013.01)
C12N 2501/999 (2013.01)
C12N 2502/1335 (2013.01)
C12N 2503/02 (2013.01)
C12N 2513/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711180504
과제번호	2019R1A2C3002300
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	뇌어셈블로이드 기반 생명체 모방 센싱 기능 바이오하이브리드 로봇
기 여 율	35/100
과제수행기관명	서강대학교
연구기간	2023.01.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711187608
과제번호	2022M3H4A1A01005271
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	나노소재기술개발
연구과제명	오가노이드 기반 약물 스크리닝용 나노바이오하이브리드 액츄에이터 칩
기 여 율	35/100
과제수행기관명	서강대학교
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711198532
과제번호	RS-2023-00259341
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	해외우수연구기관협력허브구축
연구과제명	서강-유엔 신종 감염병 테라노스틱스 융합연구센터
기 여 율	30/100
과제수행기관명	서강대학교
연구기간	2023.07.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

탄소재료, 혈관세포 및 신경줄기세포를 혼합한 혼합액을 배양하여 제조된 신경 바이오하이브리드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 탄소재료는 환원된 산화 그래핀 나노입자(reduced graphene oxide nanoparticle; rGOp), 탄소나노튜브, 탄소나노섬유 및 그래파이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 바이오하이브리드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 혈관세포는 혈관내피세포(HUVEC), 혈관내피전구세포 및 혈관평활근세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 바이오하이브리드.

청구항 4

탄소재료, 혈관세포 및 신경줄기세포를 혼합한 혼합액을 배양하여 제조된 신경 바이오하이브리드; 및
근육세포를 포함하는 하이드로젤을 배양하여 제조된 근육 번들;
을 공배양하여 제조된 신경근 접합부 모델.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 탄소재료는 환원된 산화 그래핀 나노입자(reduced graphene oxide nanoparticle; rGOp), 탄소나노튜브, 탄소나노섬유 및 그래파이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 신경근 접합부 모델.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 혈관세포는 혈관내피세포(HUVEC), 혈관내피전구세포 및 혈관평활근세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 신경근 접합부 모델.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 근육세포는 근원세포(myoblast), 근세포(myocyte) 및 근관세포(myotube)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 신경근 접합부 모델.

청구항 8

다음의 단계를 포함하는 신경 바이오하이브리드의 제조 방법:

탄소재료, 혈관세포 및 신경줄기세포를 혼합하여 배양하는 배양 단계.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 탄소재료는 환원된 산화 그래핀 나노입자(reduced graphene oxide nanoparticle; rGOp), 탄소나노튜브, 탄소나노섬유 및 그래파이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 바이오하이브리드의 제조 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 혈관세포는 혈관내피세포(HUVEC), 혈관내피전구세포 및 혈관평활근세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 바이오하이브리드의 제조 방법.

청구항 11

다음의 단계를 포함하는 운동 신경 질환 관련 약물 스크리닝 방법:

탄소재료, 혈관세포 및 신경줄기세포를 혼합한 혼합액을 배양하여 신경 바이오하이브리드를 제조하는 신경 바이오하이브리드 제조 단계;

근육세포를 포함하는 하이드로젤을 배양하여 근육 번들을 제조하는 근육 번들 제조 단계;

상기 신경 바이오하이브리드가 포함된 하이드로젤 및 상기 근육 번들을 공배양하여 신경근 접합부를 형성하는 신경근 접합부 형성 단계;

상기 근육 번들에 후보 물질을 접촉시키는 약물 접촉 단계; 및

후보 물질을 접촉시킨 근육 번들에서의 근육 수축 정도를 후보 물질을 접촉시키지 않은 근육 번들과 비교하는 약물 평가 단계.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 탄소재료는 환원된 산화 그래핀 나노입자(reduced graphene oxide nanoparticle; rGOp), 탄소나노튜브, 탄소나노섬유 및 그래파이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 약물 스크리닝 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 혈관세포는 혈관내피세포(HUVEC), 혈관내피전구세포 및 혈관평활근세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 약물 스크리닝 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 근육세포는 근원세포(myoblast), 근세포(myocyte) 및 근관세포(myotube)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 약물 스크리닝 방법.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 운동 신경 질환은 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 진행성핵상마비(progressive bulbar palsy), 가연수성마비(pseudobulbar palsy), 진행성근육위축(progressive muscular atrophy; PMA), 진행성측삭경화증(progressive lateral sclerosis; PLS) 및 단일사지근위축증(monomelic amyotrophy; MMA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 약물 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신경 바이오하이브리드, 이를 이용한 신경근 접합부 모델 및 이를 이용한 운동 신경 질환 관련 약물 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신경근 접합부(neuromuscular junction; NMJ)는 인체에서 운동 신경 세포와 근섬유 사이의 화학적, 전기적 신호를 전달하는 부위로서 원활한 근수축을 위해 매우 중요한 역할을 한다. 운동 신경 세포는 신경근 접합부를 통해 근섬유에 신호를 전달하여 근수축을 발생시킨다. 신경근 접합부 모델에서 근수축이 원활하게 기능하기 위해서는 인간의 유사한 골격근 구조와 운동 신경의 지배가 잘 갖춰진 3D 구조가 필수적이다. 이러한 골격근 조직에서 다수의 운동 신경의 결합은 근섬유와 운동 신경의 연결을 촉진하고 신경근 접합부의 시냅스 형성을 증가시킨다.

[0003] 최근 탄소나노튜브, 그래핀 및 기타 나노 물질은 높은 전기 전도성과 생체 적합성으로 인해 근육 및 신경과 같은 신경근 접합부 환경을 생성하는데 사용되고 있다. 이러한 인간 신경근 접합부와 유사한 3차원 체외 모델의 개발은 기본적인 생물학적 연구와 재생 의학 전략 개발, 운동 신경 질환에 대한 약물 스크리닝을 위한 중요한 도구를 제공할 수 있다.

- [0004] 2D 세포 배양과 달리 3D 스펀지 기반 시스템은 인간신경줄기세포(hNSCs)의 신경 분화 및 성숙의 발달을 촉진한다. 이러한 장점에도 불구하고, 체외 장기 배양 동안 현재의 스펀지 모델은 종종 미세 혈관 구조의 부족과 산소의 제한된 확산으로 인해 괴사 문제에 직면한다. 따라서 불충분한 세포-ECM 상호 작용은 응집된 스펀지 내부의 비효율적인 신경 발생 및 원치 않는 신경교 형성을 초래한다.
- [0005] 현재 뉴런 내의 혈관 세포는 산소와 영양분의 효율적인 분배를 직접적으로 지원하고 신경세포의 생존과 축삭 성장을 증진시키는 GDNF(glial-derived neurotrophic factor)와 같은 인자를 분비시킨다. 또한, 그래핀은 독특한 특성으로 인해 생체의학 응용 분야에서 가장 유망한 생체 소재 중 하나로 큰 주목을 받고 있다. 그래핀 기반 소재는 신경 발생, 신경 분화 및 신경 줄기 세포(NSCs)의 재생을 향상시키는 스캐폴드 소재로 사용되어 다양한 응용 분야에서 사용할 수 있다.
- [0006] 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis; ALS)은 운동 세포에 영향을 미치는 가장 치명적인 신경 퇴행성 질환 중 하나로 원인이 정확히 밝혀지지 않은 희귀 질환이며, 일명 '루게릭병'이라고도 한다. 뇌에서 근육으로 움직이는 신호를 전달하는 운동신경세포가 점점 쇠약 및 파괴되면서 몸의 근육이 점점 약해지며, 자발적인 움직임을 조절하는 능력 상실 및 조기 사망을 초래한다. 이러한 운동 세포 질병들의 기전이나 약물 개발을 위해서는 인간과 유사한 기능을 하는 3차원 신경근 접합부를 만드는 연구가 진행되고 있다. 이러한 ALS 기반 신경근 접합부 모델은 ALS 연구뿐만 아니라 신경 퇴행성 및 발달 신경 과학 연구의 모든 분야에 중요한 도구를 제공할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명자들은 ALS 환자 유래 바이오하이브리드가 포함된 신경근 접합부모델을 제조하고 ALS 약물을 처리하는 비교 실험을 수행한 결과, 본 발명의 신경근 접합부 모델이 ALS 약물 스크리닝에 우수한 효과가 있음을 확인하였다.
- [0008] 이에, 본 발명의 목적은 탄소재료, 혈관세포 및 신경줄기세포를 포함하는 신경 바이오하이브리드를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 탄소재료, 혈관세포 및 신경줄기세포를 혼합한 혼합액을 배양하여 제조된 신경 바이오하이브리드; 및 근육세포를 포함하는 하이드로젤을 배양하여 제조된 근육 번들;을 공배양하여 제조된 신경근 접합부 모델을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 다음의 단계를 포함하는 신경 바이오하이브리드의 제조 방법을 제공하는 것이다:
- [0011] 탄소재료, 혈관세포 및 신경줄기세포를 혼합하여 배양하는 배양 단계.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 다음의 단계를 포함하는 운동 신경 질환 관련 약물 스크리닝 방법을 제공하는 것이다:
- [0013] 탄소재료, 혈관세포 및 신경줄기세포를 혼합한 혼합액을 배양하여 신경 바이오하이브리드를 제조하는 신경 바이오하이브리드 제조 단계; 근육세포를 포함하는 하이드로젤을 배양하여 근육 번들을 제조하는 근육 번들 제조 단계; 상기 신경 바이오하이브리드가 포함된 하이드로젤 및 상기 근육 번들을 공배양하여 신경근 접합부를 형성하는 신경근 접합부 형성 단계; 상기 근육 번들에 후보 물질을 접촉시키는 약물 접촉 단계; 및 후보 물질을 접촉시킨 근육 번들에서의 근육 수축 정도를 후보 물질을 접촉시키지 않은 근육 번들과 비교하는 약물 평가 단계.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명은 신경 바이오하이브리드, 이의 제조 방법, 이를 이용한 신경근 접합부 모델 및 이를 이용한 운동 신경 질환 관련 약물 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0015] 본 발명자들은 인간과 유사한 신경근 접합부를 모방하기 위해 rGOp와 HUVEC를 hNSC 또는 iPSC에 통합하여 신경 바이오하이브리드 또는 뇌 오가노이드를 제조하는 방법을 연구하였고 본 발명을 완성하였다.
- [0016] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0017] 본 발명의 일 양태는 탄소재료, 혈관세포 및 신경줄기세포를 혼합한 혼합액을 배양하여 제조된 신경 바이오하이브리드에 관한 것이다.

- [0018] 본 발명에 있어서 상기 탄소재료는 환원된 산화 그래핀 나노입자(reduced graphene oxide nanoparticle; rGOp), 탄소나노튜브, 탄소나노섬유 및 그래파이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 환원된 산화 그래핀 나노입자인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명에 있어서 상기 혈관세포는 혈관내피세포(HUVEC), 혈관내피전구세포 및 혈관평활근세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 혈관내피세포인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0020] 상기 혼합액에 혼합된 rGO는 신경 바이오하이브리드의 신경 발생 및 분화를 강화시킬 수 있다.
- [0021] 상기 신경 바이오하이브리드 내에 매립된 혈관세포는 산소와 영양분의 효율적인 분배를 통해 신경 세포 성장과 신경망 개발을 개선시킬 수 있다.
- [0022] 본 발명의 다른 일 양태는 탄소재료, 혈관세포 및 신경줄기세포를 혼합한 혼합액을 배양하여 제조된 신경 바이오하이브리드; 및 근육세포를 포함하는 하이드로젤을 배양하여 제조된 근육 번들;을 공배양하여 제조된 신경근 접합부 모델에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명에 있어서 상기 탄소재료는 환원된 산화 그래핀 나노입자(reduced graphene oxide nanoparticle; rGOp), 탄소나노튜브, 탄소나노섬유 및 그래파이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 환원된 산화 그래핀 나노입자인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명에 있어서 상기 혈관세포는 혈관내피세포, 혈관내피전구세포 및 혈관평활근세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 혈관내피세포인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명에 있어서 상기 근육세포는 근원세포(myoblast), 근세포(myocyte) 및 근관세포(myotube)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명에 있어서 상기 신경 바이오하이브리드와 상기 근육 번들의 공배양은 3 내지 28일 동안 수행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 3 내지 21일, 3 내지 14일, 7 내지 28일, 7 내지 21일 동안 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 7 내지 14일 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 일 양태는 다음의 단계를 포함하는 신경 바이오하이브리드의 제조 방법이다:
- [0028] 탄소재료, 혈관세포 및 신경줄기세포를 혼합하여 배양하는 배양 단계.
- [0029] 본 발명에 있어서 상기 탄소재료는 환원된 산화 그래핀 나노입자(reduced graphene oxide nanoparticle; rGOp), 탄소나노튜브, 탄소나노섬유 및 그래파이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 환원된 산화 그래핀 나노입자인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명에 있어서 상기 혈관세포는 혈관내피세포, 혈관내피전구세포 및 혈관평활근세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 혈관내피세포인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 일 양태는 다음의 단계를 포함하는 운동 신경 질환 관련 약물 스크리닝 방법이다:
- [0032] 탄소재료, 혈관세포 및 신경줄기세포를 혼합한 혼합액을 배양하여 신경 바이오하이브리드를 제조하는 신경 바이오하이브리드 제조 단계; 근육세포를 포함하는 하이드로젤을 배양하여 근육 번들을 제조하는 근육 번들 제조 단계; 상기 신경 바이오하이브리드가 포함된 하이드로젤 및 상기 근육 번들을 공배양하여 신경근 접합부를 형성하는 신경근 접합부 형성 단계; 상기 근육 번들에 후보 물질을 접촉시키는 약물 접촉 단계; 및 후보 물질을 접촉시킨 근육 번들에서의 근육 수축 정도를 후보 물질을 접촉시키지 않은 근육 번들과 비교하는 약물 평가 단계.
- [0033] 본 발명에 있어서 상기 탄소재료는 환원된 산화 그래핀 나노입자(reduced graphene oxide nanoparticle; rGOp), 탄소나노튜브, 탄소나노섬유 및 그래파이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 환원된 산화 그래핀 나노입자인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명에 있어서 상기 혈관세포는 혈관내피세포, 혈관내피전구세포 및 혈관평활근세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 혈관내피세포인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명에 있어서 상기 근육세포는 근원세포(myoblast), 근세포(myocyte) 및 근관세포(myotube)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명에 있어서 상기 신경 바이오하이브리드와 상기 근육 번들의 공배양은 3 내지 28일 동안 수행되는 것일

수 있고, 바람직하게는 3 내지 21일, 3 내지 14일, 7 내지 28일, 7 내지 21일 동안 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 7 내지 14일 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명에 있어서 상기 운동 신경 질환은 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 진행성핵상마비(progressive bulbar palsy), 가연수성마비(pseudobulbar palsy), 진행성근육위축(progressive muscular atrophy; PMA), 진행성측삭경화증(progressive lateral sclerosis; PLS) 및 단일사지근위축증(monomelic amyotrophy; MMA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0038] 본 발명에서 제조된 신경 바이오 하이브리드는 줄기 세포 성장, 신경망 발달, 신경 발생 및 분화를 직접적으로 향상시켰고, 이에 신경근 접합부(NMJ) 모델에 적용하여 단순 신경 스페로이드에 비해 NMJ 운동 신경 종말과 근육 섬유 사이의 향상된 연결성이 관찰되었다.

[0039] 또한, ALS 환자 유래 바이오하이브리드(ALS-biohybrids)가 포함된 NMJ를 정상 바이오하이브리드와 비교하여 근육 수축이 감소하는 것과 ALS 약물인 보수티닙(bosutinib) 치료를 통해 근육 수축 정도가 회복되는 것을 확인하였다.

[0040] 따라서 본 발명의 신경 바이오 하이브리드가 다양한 신경 질환에 대한 약물 스크리닝 및 독성 평가에 적용될 수 있을 것으로 전망된다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따라 근육 번들을 제조하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 근육 번들을 면역염색법으로 염색하여 나타낸 형광 이미지이다.

도 1c는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 근육 번들의 자발적인 수축 정도를 나타낸 그래프이다.

도 2a는 본 발명의 일 실시예에 따라 정상 및 ALS 신경 바이오하이브리드를 제조하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 2b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 정상 신경 바이오하이브리드를 면역염색법으로 염색하여 나타낸 형광 이미지이다.

도 2c는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 ALS 신경 바이오하이브리드를 면역염색법으로 염색하여 나타낸 형광 이미지이다.

도 2d는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 신경 바이오하이브리드에서 혈관내피세포(HUVEC)의 존재를 확인하기 위해 HUVEC 마커인 CD31을 이용하여 신경 바이오하이브리드를 면역염색법으로 염색하여 나타낸 형광 이미지이다.

도 2e는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 ALS 신경 바이오하이브리드에 보수티닙(bosutinib)을 7일간 처리하여 보수티닙을 처리하지 않은 대조군과 차이를 비교한 형광 이미지이다.

도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따라 정상 및 ALS 신경 바이오하이브리드가 내장된 하이드로젤을 이용한 3D 신경근 접합부 모델을 제조하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 바이오하이브리드 및 대조군 스페로이드가 내장된 하이드로젤을 이용한 3D 신경근 접합부를 면역염색법으로 염색하여 나타낸 형광 이미지이다.

도 3c는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 3D ALS-신경근 접합부에 보수티닙을 처리한 후 시간에 따른 근육 움직임의 회복 정도를 비교한 그래프이다.

도 3d는 본 발명의 일 실시예에 따라 보수티닙 농도에 따른 근육 움직임의 회복 효과를 확인하기 위해 근육 번들의 움직임을 비교한 그래프이다.

도 3e는 본 발명의 일 실시예에 따라 보수티닙 농도에 따른 근육 움직임의 회복 효과를 확인하기 위해 근육 번들의 움직임을 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 상세히 설명하였다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0044] **실시예 1. 근육 번들 제조 및 분화된 근육 번들 확인**

[0045] 골격근세포 중 하나인 C2C12를 사용하여 인간의 유사한 골격근 구조를 모방한 3D 근육 번들을 제조하였다.

[0046] 먼저, 3D 근육 번들에 사용되는 하이드로젤을 C2C12 340 μ l, 30% 매트릭셀(Matrigel), 250 μ l 16 mg/ml 파이브로넥틴(fibronectin), 10 μ l 트롬빈(thrombin) (0.5 U/1 mg 피브리노겐(fibrinogen)), 100 μ l DMEM의 혼합물질을 이용해 제조하였다.

[0047] 그런 다음 도 1a와 같이 미리 만들어진 PDMS 몰드안에 하이드로젤을 뿌려주고, 근육세포 성장 배양액으로 10 % 소태아혈청(fetal bovine serum), 100 U/mL 페니실린-G(penicillin-G), 100 μ g/mL 스트렙토마이신(streptomycin), 1 mg/mL 아미노카프론산(aminocaproic acid; ACA)을 포함한 DMEM 배지를 넣어주었다.

[0048] 4일 동안 배양 후, 근육세포 분화 배양액으로 2 % 말 혈청(horse serum), 100 U/mL 페니실린-G, 100 μ g/mL 스트렙토마이신, 1 mg/mL 아미노카프론산, 1 ng/mL 인슐린 성장인자-1(insulin growth factor-1; IGF-1)가 포함된 DMEM 배지에 바꿔서 넣어주었다. 2일에 한 번씩 배양액을 교체하고, 14일 이상 분화를 진행하였다.

[0049] 3D 근육 번들 내의 근육세포 분화를 확인하고자 분화마커인 α -actinin을 이용하여 면역염색을 실시하였으며, 도 1b와 같이 근육 번들 내 근섬유가 확연하게 발생하는 것을 확인하였다. 또한, 14일 이상 분화 후, 도 1c에 나타난 것과 같이 자발적인 근육 수축이 일어나는 것을 확인하였다.

[0051] **실시예 2. 정상 및 ALS 신경 바이오하이브리드 제조 및 분화된 신경 바이오하이브리드 확인**

[0052] 정상 및 ALS 신경 바이오하이브리드를 제조하기 위해서 인간 신경 줄기 세포 (hNSC) 및 ALS 환자에서 유도된 다분화능 줄기세포 유래 신경 줄기 세포 (ALS-hNSC, ALS 진단을 받은 55세 백인 여성)를 20 ng/ml bFGF, 20 ng/ml EGF의 KnockOut제 DMEM/F-12 배지가 있는 라미닌 코팅 조직 배양 플레이트에서 성장시켰다.

[0053] 신경 스페로이드는 hNSC 및 ALS-hNSC (웰당 7.0×10^4 개 세포)와 혈관내피세포(HUVEC) (웰 당 7.0×10^3 개 세포) 및 환원된 그래핀 산화물 나노입자(rGO) 0.1 mg/ml를 혼합하여 도 2a와 같이 96웰 플레이트에 혼합액을 시딩하여 형성하였다. 세포 시딩 후 48시간 후, 배양 배지를 8 ng/ml bFGF, 200 ng/ml shh, 10 ng/ml 액티빈 A(activin A) 및 50 μ M 레티노산(retinal acid)이 포함된 운동 신경 분화 배지로 교체하였다. 운동 신경 분화 20일 후, 신경 바이오하이브리드의 성숙을 위해 10 ng/ml BDNF, 10 ng/ml 및 GDNF가 포함된 운동 신경 분화 배지로 교체하고 8일 동안 배양하였다.

[0054] 정상 및 ALS 신경 바이오하이브리드 분화를 확인하고자 분화 마커인 islet1 및 Tuj1을 이용하여 면역염색을 실시하였으며, 도 2b 및 2c에 나타난 것처럼 운동 신경 유전자 발현이 기존보다 확연하게 발생하는 것을 확인하였다. 또한, 도 2d에 나타난 것처럼 HUVEC를 넣은 신경 바이오하이브리드에서 혈관 마커 CD31이 발현되는 것을 확인하였다.

[0055] 그리고, ALS 신경 바이오하이브리드를 확인하고자 면역염색을 실시하여 정상 신경 바이오하이브리드에서 발견되지 않은 비정상적인 TDP-43 단백질 응집을 확인하였고, ALS 약물인 보수티닙(bosutinib)을 7일간 처리하고 난 후, 면역염색을 통해 확인한 결과 도 2e에 나타난 것처럼 TDP-43 단백질 응집의 양이 감소한 것을 확인하였다.

[0057] **실시예 3. 정상 및 ALS 신경 바이오하이브리드를 이용한 3D 신경근접합부 제조 및 확인**

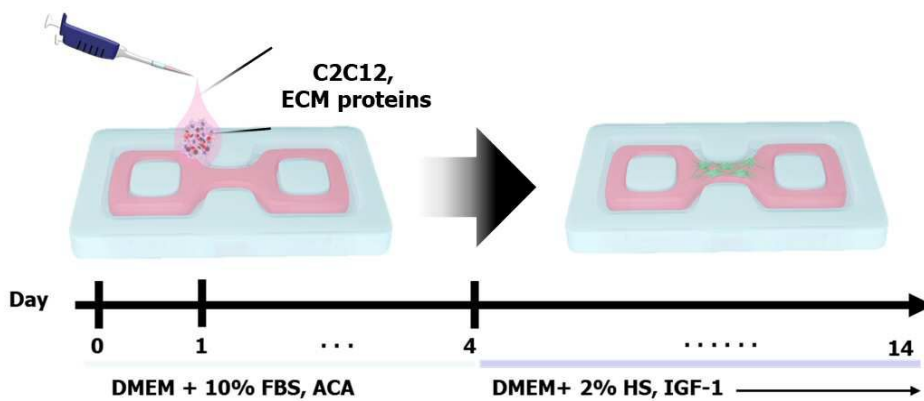
[0058] 도 3a와 같이 PDMS 몰드에서 근육 다발의 형성 및 분화를 통해 근육번들을 생성한 후, 미리 분화된 정상 및 ALS 신경 바이오하이브리드 및 CNT-COOH (0.1 mg/ml)를 ECM 단백질(30% 매트릭셀(Matrigel), 4 mg/ml 파이브로넥틴(fibronectin), 0.5 U/1 mg 트롬빈(thrombin))을 사용하여 하이드로젤을 제조하고 근육 번들 상부에 추가로 뿌려주고 공배양하였다. 공배양 분화 배지는 근육 분화 배지와 함께 다중 신경 바이오하이브리드 생존력을 지원하기 위해 뇌 유래 및 신경교 세포주 유래 신경영양 인자 (10ng/ml BDNF 및 10ng/ml GDNF)로 보충하였다. 분화 배지를 2주 동안 2일마다 교체하였다.

[0059] 도 3b에 나타난 것처럼 공배양 10일 후, 면역염색을 통해 NMJ 마커인 α -BTX를 통해 NMJ 형성을 확인하였고, 기존 신경 스페로이드보다 신경 바이오하이브리드를 사용하여 제조한 NMJ에서 가장 많은 α -BTX가 발현되는 것을 확인하였다.

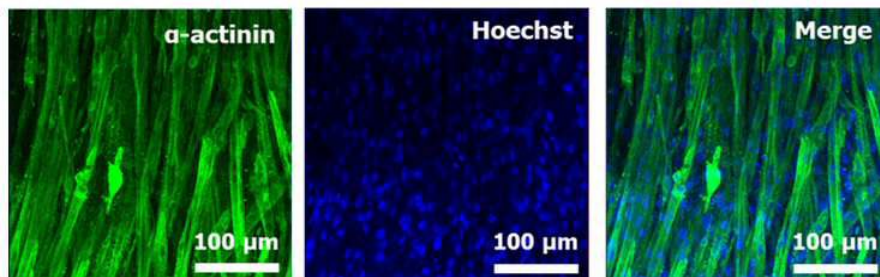
[0060] ALS 신경 바이오하이브리드를 이용하여 제조한 NMJ는 정상에 비해 근육번들의 움직임이 현저히 감소됨을 확인하였고, 도 3c와 같이 약물인 보수티닙을 5일 처리한 후, 근육번들의 수축이 정상 NMJ의 근육 움직임의 약 85%까지 회복됨을 확인하였다. 또한 보수티닙 농도에 따른 근육 수축을 측정하였고, 도 3d 및 3e와 같이 100 μ M에서 근육 움직임 회복이 가장 큰 것을 확인하였다.

도면

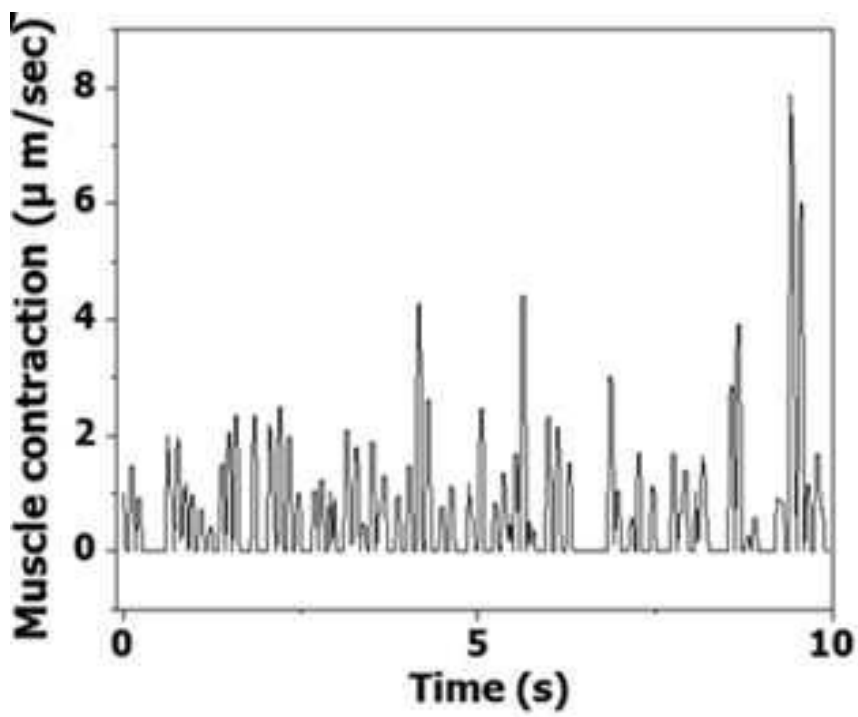
도면1a



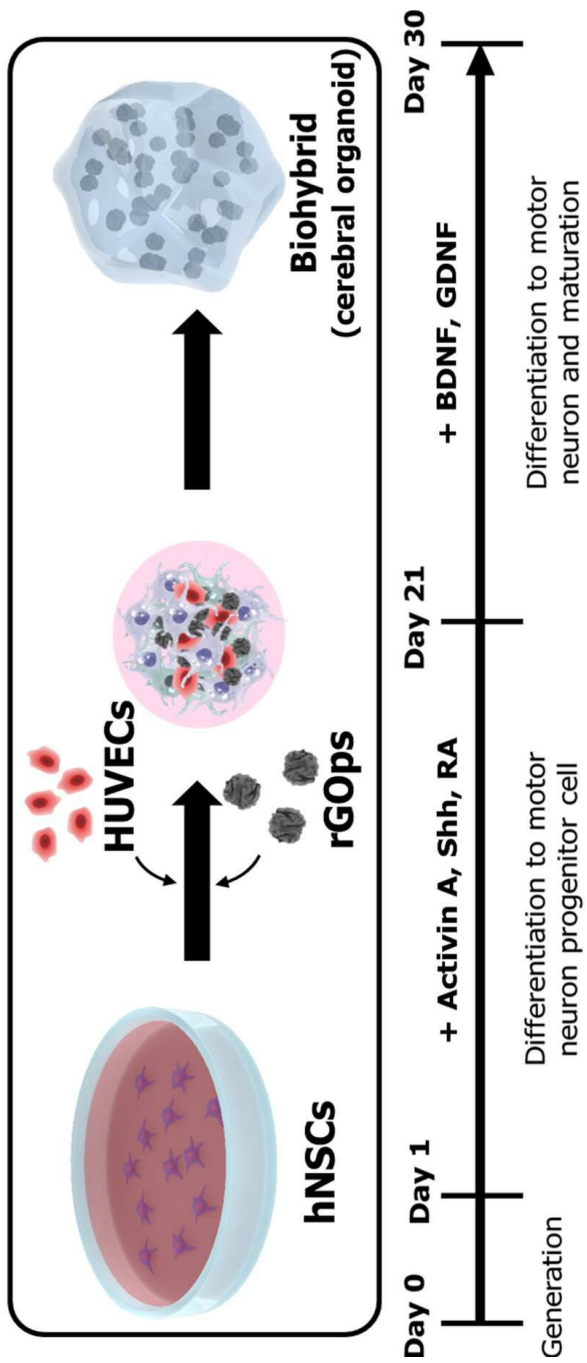
도면1b



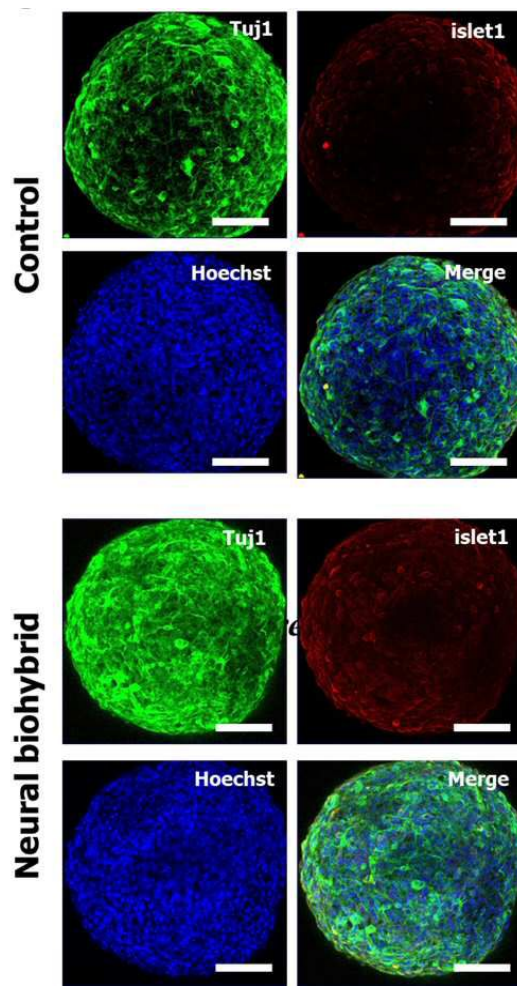
도면1c



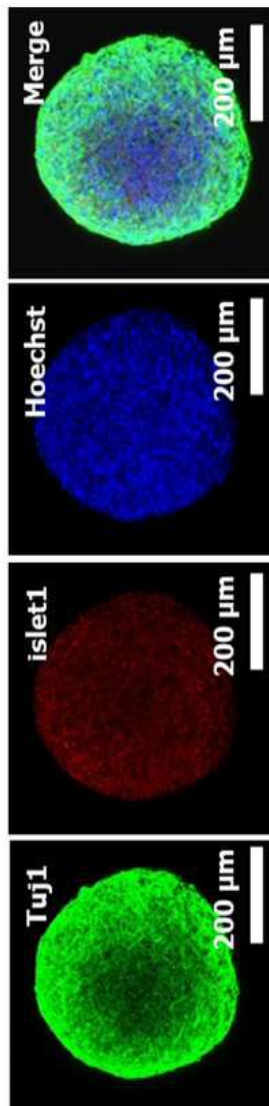
도면2a



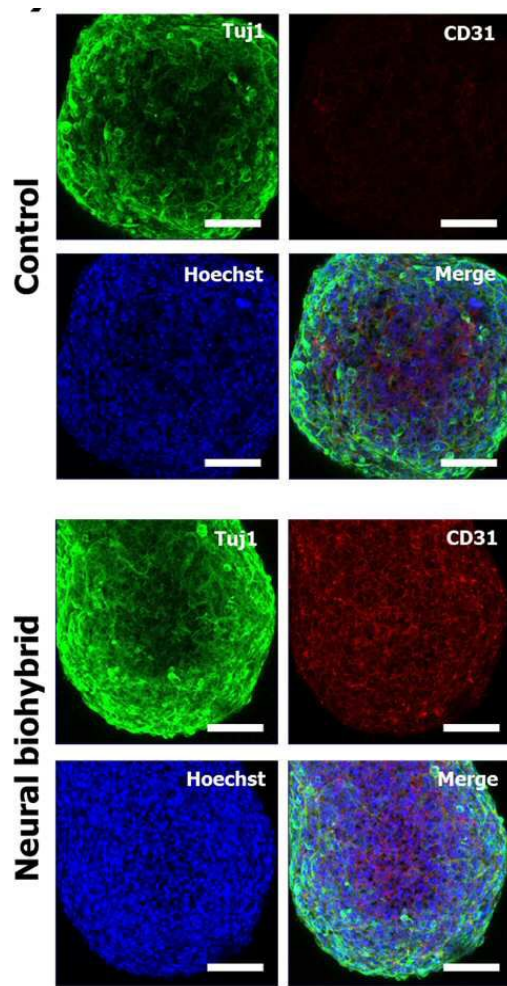
도면2b



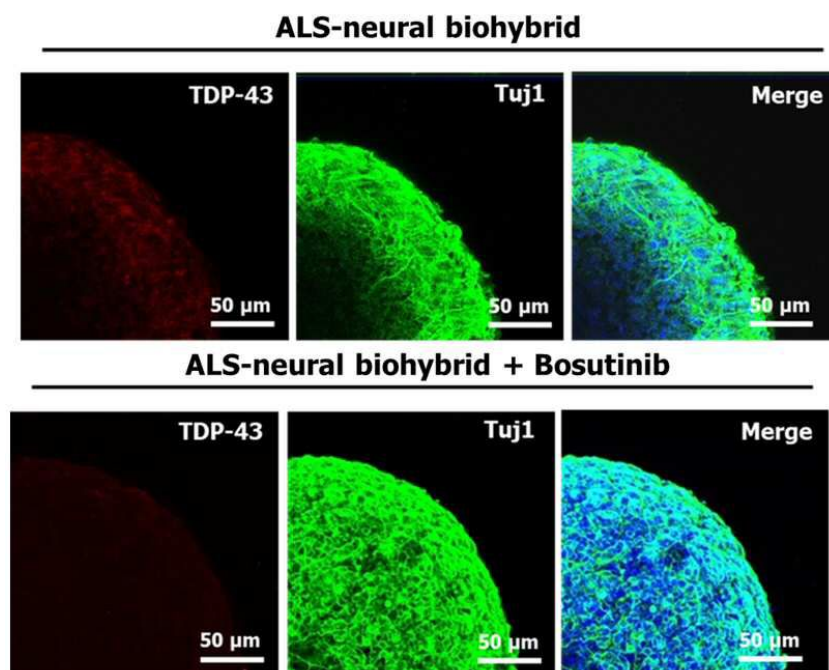
도면2c



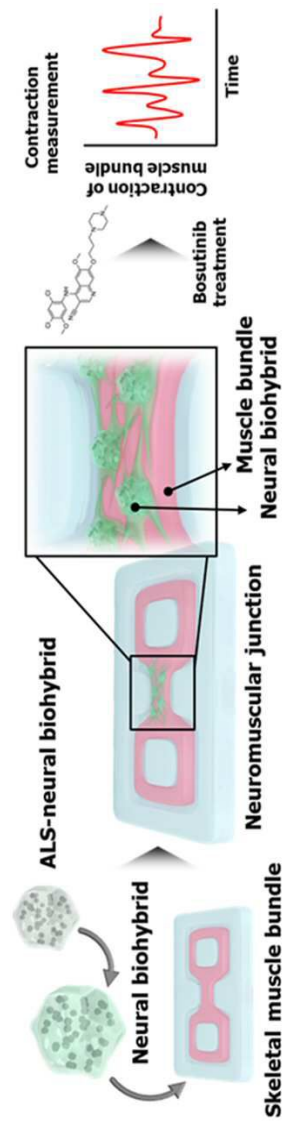
도면2d



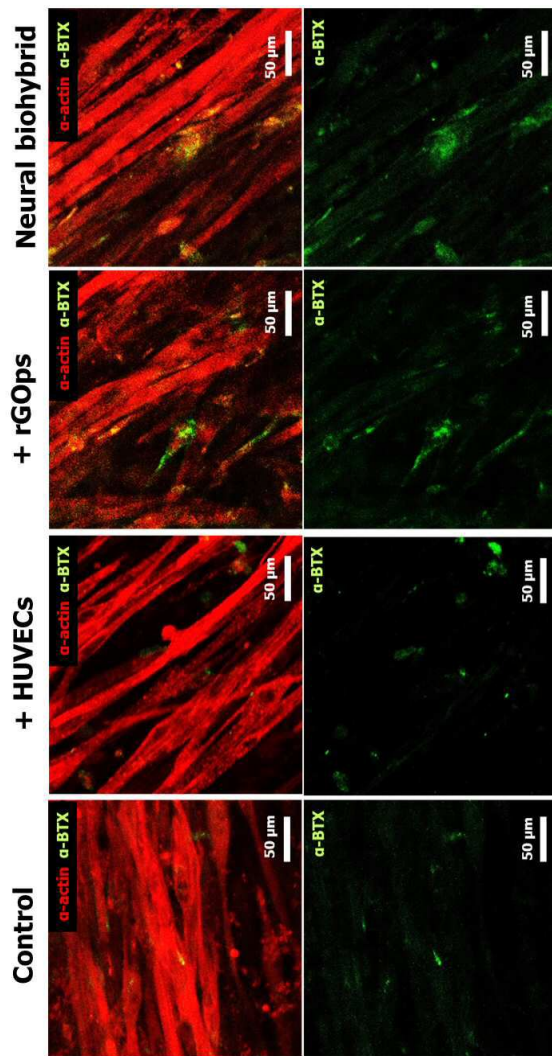
도면2e



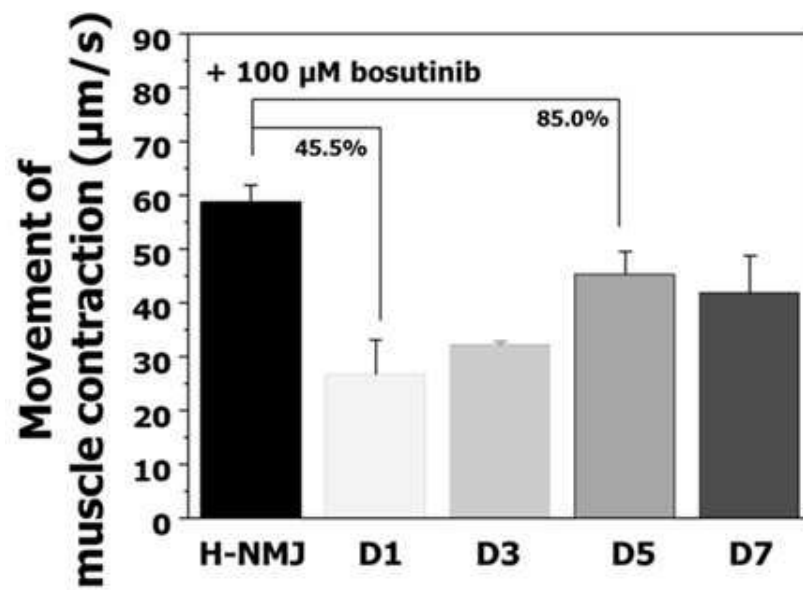
도면3a



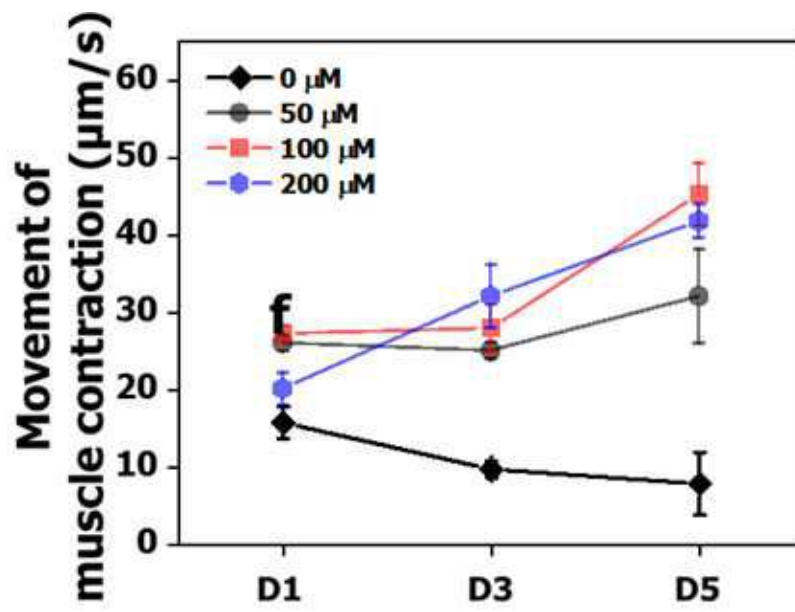
도면3b



도면3c



도면3d



도면3e

